

JF 0169495
SEP 1985

<p>36-077694/12 804 D16 S03 TAKEDA CHEMICAL IND KK 15.02.84-JP-027775 (02.09.85) C07h-21/04 C12n-15 G01n-33/53 New poly:deoxy:nucleotide for diagnosing hepatitis B etc. - obtd. by linking hapten to phosphoric acid portion opt. via ligand C86-033074</p>	<p>TAKE 15.02.84 *J6 0169-495-A <u>B(4-B4A1, 12-K4A1, 12-K4A4) D(S-H6, S-H9, S-H12)</u></p> <p>acid portion of a polydeoxynucleotide via a <u>ligand</u>, e.g. -A-Z(A = bond or -X-(CH₂)_n-; X = O, NH or bond; Z = O or NH); particularly suitable is <u>-NH-(CH₂)_nNH-</u>.</p>
<p>A novel polydeoxynucleotide (I) is obtd. by linking a hapten to the 5' terminal phosphoric acid portion directly or via a ligand.</p>	<p>DETECTION PROCEDURE PN to be detected is fixed to a support such as nitrocellulose filter in conventional manner, and if desired denatured with alkali or by heating to form a single chain PN.</p>
<p>USE For detecting a specific base sequence in a polynucleotide (PN) by hybridizing (I) with PN in cells or fixed to a support introducing fluorescence or enzyme label to the resulting hybrid immunologically, and detecting the photoresponse generated by photoexcitation or substrate addition. Genes of HBV, ATLAV or HLA can be detected, and the method is valuable in diagnosis of hepatitis B and adult leukaemia.</p> <p>HAPten Suitable haptens are 2,4-dinitrophenyl, biotinoyl, aldosterone, testosterone and diphenylhydantoin. The hapten is pref. bonded to the 5' terminal phosphoric</p>	<p>The filter contg. fixed PN is hybridized with (I) in a buffer, reacted with anti-hapten IgG or antiserum, then further reacted with enzyme- or fluorescence-labelled anti-IgG antibody. Substrate is suitable hydrogen peroxide, and dye is e.g. ortho-dianisidine.(5ppW108DAHDwgNo0/0).</p> <p>J60169495-A</p>

© 1986 DERWENT PUBLICATIONS LTD.
 128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England
 US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101
Unauthorised copying of this abstract not permitted.

⑫ 公開特許公報 (A) 昭60-169495

⑬ Int.Cl.	識別記号	厅内整理番号	⑭ 公開 昭和60年(1985)9月2日
C 07 H 21/04		7252-4C	
C 12 N 15/00		7115-4B	
G 01 N 33/53		7906-2G	
// A 61 K 39/295		7043-4C 審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)	

⑮ 発明の名称 変性されたDNAおよびその用途

⑯ 特 願 昭59-27775
 ⑰ 出 願 昭59(1984)2月15日

⑱ 発明者 福田 常彦 京都市西京区大原野西境谷町2-9番10-202号

⑲ 発明者 丸本 龍二 芦屋市奥池南町53番1号

⑳ 出願人 武田薬品工業株式会社 大阪市東区道修町2丁目27番地

㉑ 代理人 弁理士 天井 作次

明細書

1. 発明の名称

変性されたDNAおよびその用途

2. 特許請求の範囲

(1) 5'末端のリン酸部に直接またはリガンドを経てハイブンを結合せしめてなるポリデオキシクレオチド。

(2) 5'末端のリン酸部に直接またはリガンドを経てハイブンを結合せしめてなるポリデオキシクレオチドを、細胞中あるいは支持体に固定された試料中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせ、該ハイブリドに免疫学的手法で蛍光または酵素標識を導入し、光発起または基質添加によつて生じる光応答を検知することを特徴とするポリヌクレオチド中の特定塩基配列の検出法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は変性された新規DNAおよびその用途に関するもの。

生化学研究において放射性同位元素を用いる実験は敏感な方法として広く利用されている。しか

し被曝の危険性や廃棄物処理などに慎重な配慮が要求され、これらの実験を行う上には莫大な費用と特殊な空間を要する。さらに³²Pおよび¹²⁵Iなどの半減期は短かく、これらを含有する試薬は保存がきかいため用事調製といつた不便さがつきまとう。

一方、現在分子生物学において特定の遺伝子の検出あるいは同定のために、それらと相補的な塩基配列を持つデオキシクレオチド（以下DNAと略記することがある）あるいはRNAフラグメントによる核酸ハイブリッド形成法が採用されている。現在この方法は主として³²Pを使用しているが、その短い寿命故に基質研究のみに限定され、病院などにおける臨床検査の一手段としては利用されていない。

ウイルス遺伝子あるいは診断に適する異常染色体など特定DNA配列を簡便かつ迅速に検出することは臨床において特に重要であり、ある種のウイルス性疾患のように抗原が検出されない場合でも、生体組織中のウイルスゲノムを直接検出する

ことが述べられている。

最近、非放射性免疫診断法は充分放射性免疫診断法に匹敵することが示されているが、本発明者らは蛍光免疫アッセイや酵素免疫アッセイの手法を核酸ハイブリッド形成法と結合させることにより高感度の特定遺伝子診断法を開発できると考え、現地研究を行い本発明を完成した。

すなわち本発明は、5'末端のリン酸部に直接またはリガンドを経てハプテンを結合せしめてなるポリデオキシヌクレオチド、ならびに該ポリデオキシヌクレオチドを細胞中あるいは支持体に固定された試料中のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせたハイブリッドに免疫学的手法で蛍光または酵素標識を導入し、光効起または酵素活性によつて生じる光応答を検知することを特徴とするポリヌクレオチド中の特定塩基配列の検出法を提供するものである。

上記変性されたポリデオキシヌクレオチドに図し、ハプテンは低分子であつても抗原性を有するものであればいずれでもよいが、ハプテンに対する

抗体の入手容易性から2,4-ジニトロフェニルなどのジニトロベンゼン誘導体、ビオナノイル、イミノビオナノイルなどビオチン誘導体、アルドスチロン、17-β-エストラジオール、テストステロンなどステロイド類、ジフェニルヒドантインなどヒダントイン誘導体が挙げられ、とりわけ2,4-ジニトロフェニルが好ましい。

ハプテンは直接ポリデオキシヌクレオチドの5'末端のリン酸部に結合してもよいが、リガンドを経てポリデオキシヌクレオチドの5'末端のリン酸部に結合していることが好ましい。該リガンドとしては、式-A-Z-〔式中、Aは結合手または式-X-(CH₂)_n-（XはO、Nまたは結合手を、nは1～8の整数を示す）を、ZはOまたはNHを示し、ハプテンはAに、ヌクレオチドの5'末端リン酸部はZに結合している〕で表わされる盛が挙げられる。なかでもリガンドとして式、-NH-(CH₂)_nNH-（nは上記と同意義）であるものが好ましく、とりわけnが2であるものが好ましい。

上記ポリデオキシヌクレオチド（以下、ポリDNAと略称することがある）は、検出対象となる遺伝子、ウイルスなどのポリヌクレオチドの特定塩基配列に相補的なポリDNAである。該ポリDNAは塩基数として8以上、好ましくは12～1.000である。

上記ポリDNAに満し、ポリDNAの鎖長の長いものは公知の化学合成によって大差に得ることも容易である。鎖長の長いものは、ハイブリッド形成能の点で劣るためC、G含量の高いものが望ましい。一般にゲノムの特定な箇所を特異的に検出する場合には比較的鎖長の長いものがふさわしく、鎖長の長いプローブはゲノムの広領域にわたつて同定・検出する場合には有用であるが、若干特異性を欠く傾向にある。

比較的長い鎖長のプローブは、クローニングされたDNAを二本鎖のまま制限酵素によつて切り出されるが、ここで得られる異つた鎖長フラグメントはゲル電気泳動などで分離して使用されてもよいが、混合物のままハプテン化しても有利に使

用できる。

本発明の変性されたDNAを、例えばB型肝炎ウイルスの存在を検出するために用いる場合、ポリDNAとして例えば、表面抗原蛋白遺伝子とコア蛋白遺伝子との間に存在する塩基配列に相補的なTCTTATGTAAAGACCTであるか、B型肝炎ウイルスDNAを制限酵素Sau3Aで分解して得られる平均200塩基対のポリDNAであることが好ましい。

本発明の変性されたDNAは、完全なポリDNAに、所選によりリガンドを有するハプテン化試薬を反応させるかまたはハプテンを有するポリDNAの一部を残りのポリDNAまたはDNAと結合させることにより製造できる。

具体的には、例えば2,4-ジニトロフェニルエチレンジアミンやビオチンなどハプテン化試薬とポリDNAとを結合して製造することができる。

ハプテン化試薬の有するアミノ基をポリDNAのリン酸残基と反応させる場合は、トリフエニルホスファイトと2,2'-ジピリミジルジスルファイド

(I) $(\text{PhNH})_2\overset{\text{O}}{\text{P}}-\text{TCTT}$ の合成：

5'保護基を除いたトリマー(C T T) 100mgと3'-磷酸の保護基を除いた $(\text{PhNH})_2\overset{\text{O}}{\text{P}}-\text{T}$ 50mgとを乾燥ビリジン1ml中メチレンスルホニルニトロトリアゾール(M S N T) 70mgの存在下1時間結合。反応液に少量の水を加え、濾経乾固。残渣をアセトンに溶解し、白濁するまで水を加えたのちリクロプレツプR P - 8(メルク社) 30%のカムに吸着させ、アセトントリエチルアミン(0.01M) 3 : 2 v/v 混液100mlで洗い、次いで上記7 : 3 v/v 混液100mlで溶出される分画を濾経乾固。残留物を少量のクロロホルムに溶解し、これをシクロヘキサン中に滴下して得られる沈殿を遠心分離し、白色粉末84mgを得た。

(II) $(\text{PhNH})_2\overset{\text{O}}{\text{P}}-\text{TCTTATGT}$ の合成：

(I)の方法で得られたアトマーマー40mgと常法によつて合成された $\text{A T G T} 40\text{mg}$ とを常法通りMSNT 100mgで結合させ、(I)の方法と同様にして粉末状の目的物60mgを得た。

(III) $(\text{PhNH})_2\overset{\text{O}}{\text{P}}-\text{TCTTATGTAAGACCTOBz}$ の合成(完全保護ペンドカマー)：

(II)の方法で得たオクタマー40mgと3'末端の水酸基がベンゾイル基で保護されたアトマーマーAA GACCTOBz 40mgとをMSNT 100mgを用いて結合し、常法に従つて目的物60mgを単離した。

(IV) 完全保護ペンドカマーの保護基除去：

完全保護ペンドカマー60mgを酛酸-トリエチルアミン混液(2 : 1 v/v) 1.5mlに溶解。亜硝酸イソアミル0.15mlを加え35℃で7時間搅拌。反応液を濾経乾固したのち、ビリジンを加えて再度濾経し、亜硝酸イソアミルを完全に除去。残渣に濃アンモニア水5mlを加え25℃で20時間密栓放置したのち、60℃で4時間加熱。アンモニア水を留去し、残渣を0.01M重炭酸トリエチルアミンに溶かし、エーテルで2回洗浄。次にセファデックスG-50で最初に溶出される分画を分取し、続いてイオン交換高速液体クロマトグラフィー(パーテーションSAX-10, φ0.4×30cm, NaH_2PO_4 缓衝液(pH 6.3))による直

線勾配溶出法。0.15M(1.5%エタノール含有)から0.3M(3.0%エタノール含有)まで10分間で変化)において最も遅く溶出される主分画を分取し、SEP-PAK(ウォーターズ)で脱塩し、逆相高速液体クロマトグラフィー(マクレオシル-C₁₈)で单一のピークを示すもの350.0を得た。本品は細菌のアルカリホスファターゼで5'位を脱磷酸したのち、³²Pで7位を標識したATPとボリメクレオチドキナーゼで5'位を放射標識し、マキサムーゲルパート法によつて目的とする塩基配列に一致することを確認した。

実施例3

実施例2例で得たペンドカマー850μgを水30μlに溶解。ここに2',4'-ジニトロフェニルエレンジアミン13mgのN,N-ジメチルホルムアミド溶液300μlを加え、更に0℃でトリフェニルホスファイン39mgと2',2'-ジビリジルジスルフィド33mgを加えた。その後同温度で1時間毎にトリフェニルホスファインと2',2'-ジビリジルジスルフィドを一回目と同量にさらに

2度にわたつて加え、反応液に水2mlを加え、酛酸エチル2mlで2度洗浄した。水層を濾経乾固し、残渣を少量の0.01M重炭酸トリエチルアミンに溶かし、セファデックスG-50、次いで高速液体クロマトグラフィー(パーテーションSAX-10)によつて精製し、200μlの黄色粉末として、2',4'-ジニトロフェニル-NHCH₂CH₂NH-PO₂-TCTTATGTAAGACCT(DNAプローブ)を得た。

実施例4

B型肝炎ウイルスAdwの全遺伝子を含むpBR322由来のプラスミドpBR322-EcoRI/HBV933(特開昭58-194897号公報参照)1μgをEcoRIで切断し、アガロース電気泳動に付し、臭化エチジウムで蛍光染色すると二本のバンドが検出された。分子量の大きいバンド(ウイスルゲノムを含む)をニトロセルロースに転位させ、セルロース上に固定されたDNAを80℃で3時間加熱変成させ、フィルターを実施例3ではられたDNAプローブ2μgと緩衝液200μl

など脱水触媒の存在下反応させることができ、通常N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルオキシド、水やこれらの混合物など極性溶媒中を行う。反応温度は-10~10°Cである。

ハブテン化試薬の有するカルボキシル基を反応させる場合は、酸ハロゲン化物として用いることが好ましい。

かくして得られる本発明の変性されたDNAは、抽出、カラムクロマトグラフィー、再結晶、再沈殿など通常の化学的操作により分離、精製することができる。

本発明の変性されたDNAは低毒性であり、安全に、例えば以下の用途に用いることができる。

本発明の変性されたDNAを用いるポリメクレオナド中の特定塩基配列の検出は、例えば以下の方法によつて行うことができる。

検出しようとするポリメクレオナドを常法によりニトロセルロースフィルター等の支持体に固定し、所望によりアルカリ、加熱等により変性させ、一本鎖ポリメクレオナドとする。

上記メクレオナドを固定したフィルターとハイブリダイズさせる。

上記処理したフィルターを、トリス-塩酸、ヒトアルブミン等を含有する食塩水で洗浄し、ウサギ抗ジニトロフェニル-牛血清アルブミン(ウサギ抗DNP-BSA)など抗ハブテンIgGあるいは抗血清と反応させる。抗ハブテンIgG等は、ヒトアルブミンやヤギ血清を含む希釈食塩水として用いることが好ましい。

食塩水等で洗浄後、該反応させたフィルターを西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギIgG抗体など各種ペルオキシダーゼやアルシフェラーゼで酵素標識した抗IgG抗体やエテノメクレオナド、アミノヘキサンアデノシンスクレオナドなどで蛍光標識した抗IgG抗体と反応させる。該反応はヒトアルブミンやヤギ血清等の共存する食塩水中で行うことが好ましい。

上記反応したフィルターを光動起または基質液加して、生ずる光応答を検知することによりポリ

メクレオナド中の特定塩基配列の有無を知ることができる。基質としては過酸化水素など、発色剤としてはオルトジアニシジンなどを例示することができる。

本発明の変性されたDNAを用いるポリメクレオナド中の特定塩基配列の検出法により、B型肝炎ウイルス(HBV)、成人白血病ウイルス(ALK)、人白血球抗原(HLA)等の遺伝子を検出することができ、B型肝炎や成人白血病等の診断やHLA型判定のために有用である。

具体的には、診断の対象となる動物(マウス、イヌ、ヒトなど)の血清等を用い本明細書実施例6記載の方法や公知(例えば、アロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス U.S.A 第79巻、7522-7526頁、1982年)の方法に準じて行うことができる。

本明細書中記号の意義は以下のとおりである。

A: デオキシアデニル酸残基 C: デオキシシチジル酸残基

T: チミジル酸残基 Ph: フェニル

G: デオキシグアニル酸残基 Bz: ベンゾイル

以下実施例によつて本発明を具体的に説明する

が、本発明はこれらに制限されるものではない。

実施例中、保護されたメクレオナドの保護基は、5'位についてはジメトキシトリチルであり、リソ酸については α -クロロフェニルと β -シアノエチルである。

実施例1 (PhNH)₂P-OTの合成:

5'位を脱保護した保護T 460mgと1-メチルイミダゾール 120μlをピリジン10mlに溶解し、ジフェニルアミノ磷酸クロリド400mgを加えた。6時間後と20時間後に上記脱保護剤400mgと1-メチルイミダゾール120μlを追加し、4時間後に1M酢酸カリウム5mlを加えて10分間攪拌。反応液にクロロホルム20mlを加えて抽出し、クロロホルム層を0.5M鉄酸二水素カリウム、次いで水で洗い、濃縮乾固。残留物をシリカゲル30gを用い、CHCl₃-MeOH(97:3)で精製し、目的物370mgを得た。Rf=0.11(キーゼルゲル 60F-254、メルク社、クロロホルム-メタノール 19:1V/V)

実施例2

中でハイブリダイゼーションさせた。セルロースを3%のヒト・アルブミンを含む食塩水(9%NaClの10 mMトリス・塩酸緩衝液、pH 7.4)に浸し、食塩水で洗い、ウサギ抗DNP-BSA血清(10倍稀釀)の3%ヒト・アルブミン、10%ヤギ血清を含む食塩水稀釀液に2時間浸した。食塩水で5回洗い、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ウサギIgG抗体(200倍稀釀)の3%ヒト・アルブミン、10%ヤギ血清を含む食塩水に2時間浸した。再び食塩水で5回洗い、0.0025%オルトジアニシン、0.01%過酸化水素(10 mMトリス・塩酸緩衝液、pH 7.4)に30分間浸し、水洗、乾燥すると、ウイルスゲノムを含むバンドのみ赤褐色を呈し、pBR322由来のバンドは全く着色しなかつた。

実施例5

プラスミドpBR322にB型肝炎ウイルスDNAを組み込みクローニングして得られるプラスミドpBR322-EcoRI/HBV933(前出)2.3 μgを制限酵素EcoRIで消化し、アガロースグル電

気泳動で分離精製し、肝炎ウイルスDNA(470 μg)を得た。この内390 μgを制限酵素Sau3Aで分解後、精製して平均200塩基対のDNAフラグメントを含む混合物(220 μg)を得た。このDNAのうち50 μgを2,4-ジニトロフェニルエチレンジアミン(13.5 mg)と共にN,N-ジメチルホルムアミド(300 μl)-水(30 μl)の混合液に溶かし、氷冷下にトリフェニルホスファイン(3.9 mg)と2,2-ジビリミジルジスルトイド(3.3 mg)を加えた。後2者の試薬を1時間毎にさらに2回加え、最後に加えてから1時間後に水(1 ml)と酢酸エチル(4 ml)を加えて抽出した。水層を濃縮し、この溶液をセファデックスG-25のカラム(0.6 × 2.5 cm)の上端に注いだ。カラムを0.15モルの食塩を含むトリス・塩酸緩衝液(20ミリモル濃度、pH 8.0)で展開し、最も早く溶出するピークを採りた。エタノール沈殿により、2,4-ジニトロフェニルで修飾されたDNA混合物(40 μg)を得た。ニトロセルロースフィルターにプラスミド

pBR322-EcoRI/HBV933の極々の薄皮の希釈水溶液をスポットし、80°C、3時間加熱乾燥し、次いでこのフィルターを常法どうりハイブリダイゼーションの前処理に付した。前述のジニトロフェニルエチレンジアミンでハイブリダイゼーションさせたDNA(1 μg)をプローブとし、400 μlの溶液中、40度16時間、フィルター上に固定したDNAとハイブリダイゼーションさせた。以後、実施例4と同様の酵素免疫法の諸過程を施した。その結果フィルター上の1ナノグラムのpBR322-EcoRI/HBV933のスポットにまで明らかに発色が認められた。

実施例6

B型肝炎表面抗原キャリヤーの血清(300 μg)を2%のドデシル硫酸ナトリウム、サケ精液DNA(40 μg/ml)およびプロテイナーゼK(2 mg/ml)を含む150 mM食塩/10 mM EDTA/10 mMトリス塩酸(250 μg)中に加え、37°Cで4時間インキュベートしたのち、毎回の上記緩衝液を飽和したエタノール、次いでクロロ

ホルム/イソアミルアルコール(24:1)で洗う。1/10容の3M酢酸ナトリウムと2倍容のエタノールを用いてDNAを沈殿せしめ、乾燥する。これを0.3M水酸化ナトリウム(10 μl)で室温下10分間変性させ、2M酢酸アンモニウム(10 μl)で中和し、ニトロセルロース・フィルター上にスポットする。常法通りのハイブリダイゼーションの前処理に付した後、ハイブリダイゼーション(1 μg、400 μl)を用いて実施例5と同様に処理するとスポットは特有の赤褐色を呈する。

代理人 井堀士 天井作次

